

# Turbidimetrie a nefelometrie

Soustava, která obsahuje alespoň dva druhy hmoty, přičemž jeden druh je rozptýlen ve druhém ve formě více nebo méně jemných částic. Rozptýlený druh se nazývá **disperzní podíl**, spojitý druh **disperzní prostředí**. Pod pojmem druh hmoty se rozumí složka nebo fáze. Disperzní podíl může i nemusí představovat samostatnou fázi a svým chemickým složením se může, ale nemusí vždy lišit od disperzního prostředí. Podle toho mluvíme o **disperzní fázi** nebo **disperzní složce**. Převážná většina disperzí patří mezi vícesložkové soustavy.

Existuje mnoho typů disperzních soustav, které bývají klasifikovány podle různých hledisek:

- podle počtu fází na systémy
  - *homogenní* - disperzní podíl i disperzní prostředí tvoří jednu fázi,
  - *heterogenní* - disperzní podíl je od disperzního prostředí oddělen fázovým rozhraním;
 podle skupenství disperzního prostředí a disperzního podílu bývají heterogenní soustavy dále děleny:

Disperzní prostředí	Disperzní podíl	DISPERZE	
		koloidní	hrubé
plynné	plynný	–	–
	kapalný	aerosoly (mlhy)	děšť, mlhy
	tuhý	aerosoly (dýmy)	prach, dýmy
kapalné	plynný	pěny	bubliny, pěny
	kapalný	emulze	emulze
	tuhý	lyosoly	suspenze
tuhé	plynný	tuhé pěny	tuhé pěny, minerály s uzavřenými plyny
	kapalný	tuhé emulze	tuhé emulze, minerály s uzavřenými kapičkami
	tuhý	tuhé soly	tuhé směsi, např. eutektika

- podle počtu molekul v částici disperzního podílu
  - systémy *molekulární*: analytické disperze a roztoky makromolekul,
  - systémy *polymolekulární*: asociativní koloidy, lyofobní soly a hrubé disperze;
- podle velikosti částic disperzního podílu (lineárního rozměru  $d$ )
  - hrubé disperze -  $d > 10^{-6}$  m,
  - koloidní disperze -  $10^{-9}$  m  $< d < 10^{-6}$  m,
  - analytické disperze -  $d < 10^{-9}$  m (pravé roztoky);
- podle tvaru částic
  - globulárně disperzní – s izometrickými částicemi
  - laminárně disperzní – s anizometrickými částicemi, jejichž jeden rozměr je řádově menší než ostatní,
  - fibrilárně disperzní – s anizometrickými částicemi, jejichž jeden rozměr je řádově větší než ostatní;
- podle struktury disperzního podílu
  - na systémy s disperzním podílem ve formě částic,
  - na systémy, u nichž částice disperzního podílu vytvářejí souvislou prostorovou síť, která prostupuje kapalně disperzní prostředí (gely);
- podle rozdělení velikosti částic
  - monodisperzní (uniformní) – s částicemi stejné velikosti (s výjimkou analytických disperzí se vyskytují velmi zřídka),
  - paucidisperzní, obsahující několik diskrétních velikostních frakcí částic
  - polydisperzní (neuniformní) – obsahují částice mnoha různých velikostí

Rovnice pro intenzitu světla rozptýleného jednotkou objemu zředěné (nikoliv *krajně* zředěné) disperzní soustavy s kapalným disperzním prostředím a malými disperzními částicemi ( $< \lambda/20$ ), odvozená na základě flukтуаční teorie:

$$I_{\theta} = I_0 \frac{4\pi^2 n_0^2 F(\theta) w}{N_A \lambda^4 r^2 \left( \frac{1}{M} 2Bw + \dots \right)} \left( \frac{dn}{dw} \right)^2$$

(Einsteinova-Debyeova rovnice pro rozptyl světla)

kde  $I_{\theta}$  je intenzita světla rozptýleného objemovou jednotkou disperzní soustavy pod úhlem  $\theta$

$I_0$  je celková intenzita dopadajícího záření

$n$  je index lomu disperzní soustavy

$n_0$  je index lomu čistého disperzního prostředí

$w$  je hmotnostní koncentrace

$M$  je molární hmotnost disperzního podílu

$\lambda$  je vlnová délka primárního a rozptýleného světla

$r$  je vzdálenost detektoru, měřícího intenzitu, od zdroje rozptýleného světla

$\theta$  úhel pozorování, sevřený primárním paprskem a paprskem rozptýleného světla, který dopadá do detektoru

$F(\theta)$  je funkce úhlu pozorování jejíž tvar závisí na charakteru primárního paprsku  $B$  druhý viriální koeficient – stejný jako u viriálního rozvoje pro vyjádření koncentrační závislosti osmotického tlaku, záporné hodnoty  $B$  charakterizují disperzní systémy, ve kterých převládají přitažlivé síly mezi částicemi. Disperzní částice pak jeví tendenci ke shlukování – proto je v daném okamžiku v některých objemových elementech koncentrace podstatně vyšší než v jiných. Nastávají silné fluktuace – se zápornou hodnotou  $B$  je spojena velká intenzita rozptýleného světla. Naopak při kladných hodnotách  $B$  převažuje vliv odpudivých sil, které vedou k rovnoměrnějšímu rozdělení disperzních částic v prostoru, a tedy ke snížení průměrné fluktuace a nižší hodnotě  $I_\theta$ .

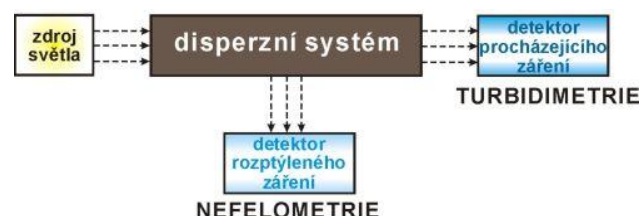
Turbidimetrie a Nefelometrie jsou metody využívající rozptylu světla částicemi v suspenzních a koloidních roztocích. Liší se jen umístěním detektoru. Slouží k určování koncentrace suspendované látky. Ke stanovení se používá metoda kalibrační křivky.

## Nefelometrie

Nefelometrie měří rozptýlené záření nejčastěji ve směru kolmém na vstupující paprsek a užívá se jí pro nižší koncentrace rozptýlených částic. V případě turbidimetrie je detektor umístěn v ose paprsku a měříme tak záření prošlé vzorkem, které je ochuzené o rozptýlenou složku záření, je vhodná pro koncentrovanější roztoky.

Optické analytické metody využívající rozptylu světla na heterogenních částicích v koloidních roztocích a mikrosuspensích (turbidimetrie, nefelometrie) vychází ze základních podmínek pro měření:

- využívají zdroje UV-VIS monochromatického záření
- velikost částic musí být jednotná a blízká vlnové délce použitého záření
- reakční prostředí (koncentrace činidel, teplota) ovlivňuje velikost částic
- částice nesmí během měření sedimentovat – proto se přidávají ochranné koloidy
- rozptyl je založen na Tyndallově efektu (rozptýlené záření na částicích má stejnou vlnovou délku jako záření dopadající na koloidní částice)
- intenzita rozptýleného záření závisí také na objemu částic v objemové jednotce (na koncentraci).

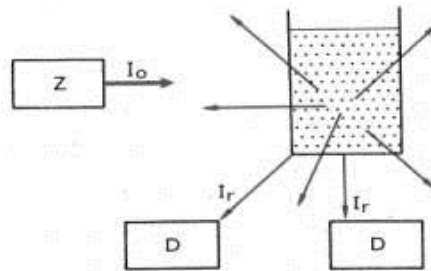


Obrázek 1: Rozdíly turbidimetru a nefelometru

Rozptýlené světlo ( $I_r$ ) vychází z roztoku všemi směry (tzv. Tyndallovo světlo) a měří se (D) pod úhlem, který je odlišný od směru dopadajícího záření.

Pro nefelometrické měření jsou používány:

- nefelometrický nástavec k fotometru (Tyndallovo světlo se sleduje pod úhlem  $90^\circ$ )
- speciální přístroje – nefelometry



Obrázek 2: Schéma nefelometru

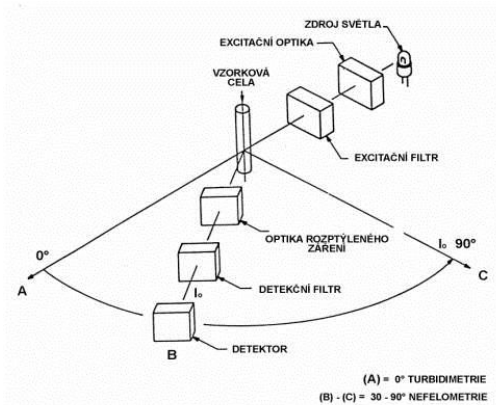
### Konvenční nefelometry

Světelným zdrojem je obvykle žárovka s halogenovou atmosférou nebo xenonová výbojka. Optika těchto přístrojů obsahuje navíc interferenční filtr, neboť světelný zdroj poskytuje polychromatické světlo. Detektor je nastaven pod úhlem  $70^\circ$  až  $90^\circ$ , protože stupeň směrovosti světla z konvenčního zdroje je nízký.

### Laserový nefelometr

Laserový nefelometr používá jako světelného zdroje helium-neonového laseru. Tento zdroj mono-chromatického světla je mimořádně intenzivní a má vysoký stupeň směrovosti. Laserový paprsek prochází přes kyvetu s měřeným roztokem a rozptýlené světlo se sleduje detektorem nastaveným pod úhlem  $5$  až  $35^\circ$  (fotonkou nebo fotonásobičem).

Pro přibližně stejné přístrojové vybavení obecně platí, že nefelometrie je asi o jeden řád citlivější než turbidimetrie. Schéma instrumentálního uspořádání je patrné z obrázku.



Obrázek 3: Rozdílné umístění detektorů pro turbidimetrii a nefelometrii, schéma obou přístrojů

Při nefelometrii se měří záření rozptýlené na částicích (obvykle komplexů antigen-protilátka), měří se tedy intenzita difúzního rozptylu. Vlnová délka difúzně rozptýleného záření a záření zdroje je stejná, i když v malém rozsahu dochází na částicích k emisi záření o delší vlnové délce. Optimální poměr mezi vlnovou délkou záření monochromatického zdroje a poloměrem částic je 10:1. Nefelometrické měření se provádí nejčastěji ve dvou modifikacích, „end-point“ nebo kinetické.

### Měření „end-point“

- měření po uplynutí určitého časového intervalu
- nejčastěji jde o dobu 30-60 minut, ale je známo, že již po 10 minutách je přítomno dost imunokomplexu pro reprodukovatelné měření
- spolehlivost stanovení je též značně závislá na způsobu uchovávání reakčního produktu

### Kinetické měření

Využívá vyhodnocení rychlosti nárůstu zákalu v čase

Lze stanovit minimálně 1 mg/l; vhodným přístrojovým uspořádáním za využití výpočetní techniky je možno mez stanovitelnosti snížit o jeden až dva řády

Zákalové metody ve vodném prostředí jsou používány především pro imunochemické reakce, vyznačují se vysokou přesností a dobrou reprodukovatelností.

Závislost odezvy nefelometru na koncentraci stanovované bílkoviny je obecně nelineární. Jde většinou o polynom druhého či třetího řádu. V případě vhodně zvolených podmínek je možno závislost aproximovat proložením přímkou. Obecně platí, že linearita měření je tím lepší, čím je koloidní disperze více naředěna nebo je menší velikost částic.

## **Stanovení specifických proteinů**

Příkladem aplikace nefelometrie je stanovení jednotlivých plazmatických bílkovin. V současné době se prakticky výhradně používají imunochemické metody. Jedná se o skupinu metod využívající specifickou reakci antigenu (plazmatické bílkoviny) s protilátkou (frakce zvířecího hyperimunitního séra). Reakcí antigenu s protilátkou vznikají imunokomplexy, na jejichž vizualizaci a kvantifikaci jsou pak založeny jednotlivé metodiky stanovení. Laboratorně velmi výhodné (z hlediska rychlosti provedení, přesnosti i produktivity práce) jsou optické metody, kdy reakce probíhá v kapalném prostředí. V pufru (nejčastěji fosfátový) za přídavku polyetylenglykolu 6 000 nastane precipitace imunokomplexů. Jejich koncentrace je při stálém nadbytku protilátky úměrná koncentraci antigenu, tj. stanovované bílkoviny ve vzorku.

### **Interference**

Na zákalové měření koloidů mají vliv vlastní zákalové séra. Silně lipemická séra je nutno ze zpracování vyřadit. Důvodem je hlavně obtížnost měření malého přírůstku turbidance (absorbance, zákalových jednotek) komplexů antigen-protilátka na relativně vysokém pozadí zákalu. Při nefelometrickém měření se vzorky ředí ve vyšším poměru než u turbidimetrie; ani tam by však neměl porovnávací roztok vzorků přesáhnout 25 % RLS. Barviva, produkty hemolýzy a žlučové pigmenty (ikterická a hemolytická séra), mají větší vliv na nefelometrii než na turbidimetrii.

### **Iontová síla vzorků**

Ve fyziologickém rozmezí nemá významný vliv na reakci antigen-protilátka. Na stanovení má vliv použitý materiál reakčních nádob a jejich tvar (rovnoměrnost tvorby koloidně-disperzních komplexů a jejich stabilita), osvětlení (hlavně vlnové délky mimo viditelnou oblast) a teplota stanovení. Důležitý je vliv polyethylenglykolu.

### **Titration protilátek**

Jde o orientační údaj, spíše jen o relativní hodnoty. Titry dvou šarží protilátek proti jedné bílkovině se mohou i dost výrazně lišit. S tím je třeba počítat při ředění protilátky a eventuální snížení titru kompenzovat nižším ředěním antiséra.

### **Některá omezení**

Pro stanovení plazmatických bílkovin by se zásadně měly používat pouze protilátky k tomu účelu připravené. Pro zákalová měření koloidů jde o imunoglobulinové frakce příslušných antisér.

## **Afinita a avidita**

Vysoká **afinita** znamená vysokou „přichylnost“ protilátek k jejich odpovídajícím antigenním epitopům. Je podstatná pro rychlost reakce, zatímco **avidita**, která ovlivňuje tvorbu komplexů (částic), je důležitá pro měření „end-point“. Obě charakteristiky nejsou nutně paralelní. Někdy může docházet i k vyloučení precipitátu, jestliže avidita a afinita jsou příliš vysoké. Tomu se dá zabránit změnou protilátky nebo snížením koncentrace polyetylenglykolu. Velmi rychlé reakce s vysoce afinními protilátkami mohou také být značným problémem při práci s automatickými analyzátory.

## Turbidimetrie

Turbidimetrie je založena na měření stupně zákalu (turbidity). Na částicích dochází k rozptylu záření a částečně i jeho absorpci. Sleduje se pokles intenzity záření procházejícího absorbuující a rozptylující vrstvou. Měření se provádí v přímém směru, v ose světelného paprsku zdroje jako u fotometrických postupů. Při turbidimetrických měřeních je obtížné připravit reprodukovatelně suspenzi měřené reakční směsi, aby byla dostatečně stálá. K tomu účelu se používají ochranné koloidy (např. polyethylenglykol). Fotometrická citlivost je nepřímě úměrná vlnové délce, proto je vhodné měřit při nejkratší vlnové délce dosažitelné standardním fotometrem (340 nm v blízké UV oblasti).

Měření se provádí v přímém směru, v ose světelného paprsku zdroje. Ve zvláště zředěných disperzích (roztocích) je přechod mezi absorpční fotometrií a turbidimetrií neostrý, a proto lze měřenou veličinu  $T_b$  (turbidance), již odpovídá v absorpčním fotometru  $A$  u klasické absorpční fotometrie (absorbance), vyjádřit vztahem

$$T_b = (e + T)cL,$$

kde  $e$  je absorpční koeficient,  $T$  turbiditní koeficient,  $c$  je koncentrace,  $L$  je světelná dráha měřicí kyvety.

Závislost turbidance (absorbance) na koncentraci analytu je obecně nelineární (jde většinou o polynom 2. řádu). V případě vhodně zvolených podmínek je možno závislost aproximovat proložením přímkou. Turbidance závisí nepřímě na čtvrté mocnině vlnové délky. Proto se v současné době prakticky výhradně využívá měření v UV oblasti. Výrazný je vliv teploty, která ovlivňuje tvorbu i velikost částic.

K turbidimetrickému měření zákalu se obvykle využívají klasické absorpční fotometry a automatické analyzátory pracující metodou absorpční fotometrie.



**Úloha 1: Podrobně se seznamte s obsluhou Turbidimetru HACH a proveďte jeho kalibraci**

Pomůcky: Návod k obsluze, kyvety, turbidimetr, automatické pipety, špičky

Chemikálie: standardy 1 NTU a 20NTU, silikonový olej

Postup:

1. Připravte nádobku k použití tak, že ji řádně omyjete miliQ vodou
2. Otřete papírovým kapesníkem
3. Kápněte na každou vnější stěnu nádobky silikonový olej a rozetřete jej přiloženou utěrkou
4. Protřepejte nádobky se standardními roztoky po dobu 2-3 minut, aby se resuspendovaly veškeré částice
5. Protřepané standardy nechejte 5 minut odstát
6. Jemným převrácením lahvíček promíchejte roztoky po dobu 5-7 minut
7. Propláchněte nádobku standardem
8. Naplňte nádobku 5 ml 1.0 NTU standardu a nechejte stát 1 minutu
9. Zavřete nádobku a otřete z ní veškeré nečistoty
10. Vložte nádobku do přístroje
11. Přikryjte nádobku nástavce a vyčkejte 30 sekund
12. Přidržte tlačítko CAL a stiskněte tlačítko READ
13. Po chvíli se na displeji objeví dA
14. Stiskněte tlačítko CAL, na displeji se objeví C1.0 problikávající s 1.0 NTU
15. Naplňte novou nádobku 5 ml standardu 20 NTU a zavíčkujte
16. Odstraňte veškeré nečistoty z povrchu nádobky
17. Vložte nádobku do přístroje, zakryjte a vyčkejte 30 sekund
18. Stiskněte CAL, na displeji se objeví C20 problikávající s 20 NTU
19. Pro ukončení kalibrace stiskněte opět CAL. Na displeji se objeví CLd

**Úloha 2: Turbidimetricky určete počet buněk pekařských kvasinek v neznámém vzorku**

Pomůcky: Turbidimetr, turbidimetrické kyvety pipety, špičky, falkonky

Chemikálie: pekařské kvasnice, PBS 1x

Postup:

1. Ze zásobního roztoku připravte roztoky pro změření kalibrační přímky  $10^3$ - $10^7$  buněk /ml.
2. Změřte a запиšte hodnoty turbidity pro připravené roztoky.
3. Změřte a запиšte hodnotu turbidity pro neznámý vzorek.
4. Určete koncentraci buněk v neznámém vzorku.

Literatura:

Vinter V a kol.: Experimenty pro přírodovědné kroužky, Přf UP Olomouc, 2013  
[http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-001/hesla/mereni\\_rozptylu\\_svetla.html](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/mereni_rozptylu_svetla.html)  
[http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD\\_DS3/hypertext/IVABV.htm](http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS3/hypertext/IVABV.htm)